

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ- БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На II редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 15.11.2019. године, на основу молбе ментора др Божидарке Зарић, вишег научног сарадника, Универзитета у Београду-Институт за нуклеарне науке „Винча” и др Јелене Ђорђевић, редовног професора, Универзитета у Београду-Биолошки факултет одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Иване М. Ресановић**, стручног сарадника, Универзитета у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча”, под насловом **„Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом”** у саставу:

1. др Божидарка Зарић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за нуклеарне науке „Винча”- ментор,
2. др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет- ментор,
3. др Зоран Глувић, доцент, Универзитет у Београду- Медицински факултет- члан.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација Иване М. Ресановић, под насловом **„Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом”**, урађена је у Институту за нуклеарне науке „Винча” у Београду у оквиру пројекта под бројем 173033, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије (руководилац: др Есма Исеновић), а у сарадњи са Службом за ендокринологију и дијабетес, Службом за баромедицину, као и Одељењем интернистичке интензивне неге Клиничко-болничког центра Земун у Београду.

Докторска дисертација је написана на 153 стране куцаног текста и подељена је на уобичајена поглавља: Увод (34 стране), Хипотеза (једна страна), Циљеви рада (једна страна), Материјал и Методе (19 страна), Резултати (28 страна), Дискусија (17 страна), Закључци (две стране) и Литература (51 страна). У дисертацији је цитирано 476 библиографских јединица. Такође, у докторску дисертацију унети су подаци о менторима и члановима комисије, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница, биографија аутора и потписане изјаве.

## Анализа докторске дисертације

Докторска дисертација **Иване Ресановић** обухвата уобичајена поглавља. Прво поглавље **УВОД** (34 стране) подељено је у шест целина које су поткрепљене са 12 илустрација. У оквиру прве целине, на прегледан и систематичан начин, је описана етиопатогенеза, подела и дијагностика шећерне болести (ДМ). Иако се сматра застарелом, класификација ДМ на инсулин-зависни (ИДДМ) и инсулин-независни (НИДДМ), и даље има велико упориште међу клиничарима. Такође, у актуелној Међународној класификацији болести и узрока смрти, дијагноза Е10 укључује дијабетес на инсулинској терапији, а шифра Е11 дијабетес који се не третира инсулином. У овој дисертацији је задржана класификација на ИДДМ и НИДДМ, јер је критеријум био да су пацијенти на инсулинској терапији. У другом делу уводног поглавља, кандидаткиња је на савремен и сажет начин описала молекулске основе деловања инсулина у физиолошким и патофизиолошким условима. Нарочиту пажњу посветила је процесу биосинтезе масних киселина (МК) и њиховој улози у развоју ДМ. У четвртој целини поглавља **УВОД**, **Ивана Ресановић** је детаљно навела досадашња сазнања о улози азот-моноксида (NO) у развоју ДМ и васкуларних компликација. Такође је истакла да је NO медијатор у различитим сигналним путевима. Детаљно је описала опште карактеристике ензима који учествује у синтези NO, азот-моксид-синтазе (NOS), са посебним освртом на индуцибилну изоформу (iNOS), њену структуру и функцију. У наставку су прегледно издвојени и описани сигнални молекули за које је показано да су укључени у контролу експресије и активности iNOS, као што су: супстрат рецептора за инсулин 1 (IRS-1), фосфатидилинозитол 3 киназа (PI3K), протеин киназа Б (Akt), киназа регулисана ванћелијским сигналимa 1 и 2 (ERK1/2) и нуклеарни фактор капа Б (NFκB). Осим што је истакнута улога iNOS у развоју ДМ и васкуларних компликација, наговештена је и улога протеина који везује фактор раста сличан инсулину 1 (IGFBP-1), о чему је мало података у литератури. Даље је кандидаткиња описала типове васкуларних компликација код пацијената са ИДДМ, као и механизме њиховог настанка. Последњи одељак уводног дела дисертације посвећен је терапији васкуларних компликација код оболелих од ИДДМ, међу којима је и примена терапије кисеоником под хипербаричним условима (ХБК). У уводном делу постављене су полазне основе на које ће се кандидаткиња ослањати у дискусији добијених резултата.

У поглављу **ХИПОТЕЗА** (једна страна), ауторка је пошла од претпоставке да третман ХБК остварује повољне ефекте на оболеле од ИДДМ са васкуларним

компликацијама тако што утиче на промену нивоа и састава МК у плазми, као и регулацију експресије и активности iNOS у лимфоцитима. У основи хипотезе ове дисертације је чињеница да терапија инсулином не доводи увек до адекватне дневне контроле гликемије, односно да неадекватна контрола ИДДМ доводи до дисфункције ендотела, развоја атеросклерозе и васкуларних компликација код ових пацијената. Услед хипергликемије и хипоксије, које прате ИДДМ, дошло би до промене у нивоу и саставу МК у плазми и повећања експресије и активности iNOS у лимфоцитима. У циркулацији пацијената са ИДДМ повећала би се концентрација засићених МК (SFA) и n-6 полинезасићених МК (n-6 PUFA), које доводе до развоја инфламације и атеросклерозе, а смањила концентрација мононезасићених МК (MUFA) и n-3 PUFA, које остварују антиатерогена и антиинфламаторна својства. Оваква промена у нивоу и саставу МК довела би до поремећаја сигналних путева инсулина, што има за последицу активацију транскрипционог фактора NFκB и покретање транскрипције гена за iNOS.

У поглављу **ЦИЉЕВИ РАДА** (једна страна), ауторка **Ивана Ресановић** је на јасан и концизан начин изложила циљеве рада, који обухватају изучавање утицаја терапије ХБК на: 1. Концентрацију параметара метаболизма глукозе у плазми оболелих од ИДДМ (гликемија и инсулин) 2. Концентрацију параметара липидног профила у плазми оболелих од ИДДМ (укупни холестерол, триглицериди (Tg), холестерол без липопротеина велике густине (HDL), HDL и липопротеини мале густине (LDL)); 3. Ниво и састав МК у плазми оболелих од ИДДМ; 4. Концентрацију маркера инфламације у плазми и серуму оболелих од ИДДМ (Ц-реактивни протеин (CRP), хомоцистеин (Hcy) и NO); 5. Регулацију експресије и активности iNOS у лимфоцитима оболелих од ИДДМ; 6. Експресију сигналних молекула: IRS-1, PI3K, Akt, ERK1/2 и NFκB, као и њихову улогу у регулацији експресије и активности iNOS у лимфоцитима пацијената са ИДДМ и 7. Експресију IGFBP-1 у серуму оболелих од ИДДМ.

Следеће поглавље у дисертацији **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** (19 страна) подељено је у пет целина у којима су детаљно представљени примењени експериментални протоколи, поткрепљени са четири илустрације на одговарајућим местима, као и критеријуми за регрутовање испитаника за учешће у овој студији. Све експерименталне процедуре у оквиру ове дисертације су биле у складу са препорукама Етичког комитета Клиничко-болничког центра Земун и етичким принципима Хелсиншке декларације о медицинским истраживањима и принципима добре научне и клиничке праксе. У докторској дисертацији кандидаткиње **Иване Ресановић** учествовали су оболели од ИДДМ са утврђеним присуством васкуларних компликација, а који су на препоруку Републичке здравствене комисије упућени на лечење терапијом ХБК у КБЦ Земун ("Службени гласник РС", бр. 81/2015 - даље: Правилник). У студију су првобитно била укључена 52 пацијента са ДМ, од којих је 37 пацијената са ДМ и васкуларним компликацијама, који су били на инсулинској терапији и зато је задржан термин ИДДМ. Од 37 пацијената са ИДДМ, 28 је испунило све критеријуме за учествовање у студији (присуство ИДДМ и васкуларних компликација, одсуство запаљенских процеса и улцерација на екстремитетима услед ДМ, одсуство контраиндикација за примену терапије ХБК и излагање терапији ХБК по први пут), док преостали нису окончали терапију услед: фобије од хипербаричне

коморе, повећаног крвног притиска пре уласка у хипербаричну комору, кардиолошких или неуролошких компликација, одустајања од даљег лечења итд. Од 15 пацијената са NIDDM, само је 11 завршило терапију, од којих је већини уведена терапија инсулином током терапије ХБК, што их је дисквалификовало за даље учешће у студији. У циљу процене утицаја ХБК, коришћен је дизајн поновљеног мерења на испитиваној групи оболелих од ИДДМ. Терапија ХБК је подразумевала излагање оболелих од ИДДМ 100% кисеонику под притиском до 2,4 апсолутних атмосфера (АТА) у комори у трајању од једног часа дневно током десет појединачних третмана. За експерименте спроведене у оквиру ове студије су коришћени узорци крви пацијената са ИДММ из којих су изоловани плазма, серум и лимфоцити пре и након десет третмана ХБК. Узимајући у обзир да су лимфоцити добро познати медијатори инфламаторних процеса и обољења као што су ДМ и атеросклероза, представљали су адекватан модел за изучавање молекулских механизма инфламације код оболелих од ИДДМ са васкуларним компликацијама. У овом поглављу описане су методе одређивања антропометријских параметара, протокол за мерење крвног притиска, затим метода изоловања плазме и серума из узорака крви испитаника и метода анализе хематолошких параметара. Такође су описане следеће методе: имуно-инхибициона метода за мерење нивоа HbA1c у крви, радиоимунолошка метода за одређивање концентрације инсулина у серуму, флуоресцентна поларизациона имуноанализа за одређивање концентрације Hcy у плазми, као и спектрофотометријске методе за мерење концентрације глукозе, липида, фосфолипида, СМК, CRP, NO и активности аргиназе у крви. Даље је описана метода гасне хроматографије којом је одређиван удео појединачних МК у односу на састав укупних МК из липида плазме испитаника. Метода електрофорезе на полиакриламидном гелу, трансфера протеина на мембрану и имунодетекције коришћена је за изучавање експресије следећих протеина: iNOS, NFκB-p65, IRS-1, PI3K, Akt и ERK1/2 у лимфоцитима, IGFBP-1 у серуму, као и фосфорилисаних сигналних молекула: NFκB-p65 на Ser<sup>536</sup>, IRS-1 на Ser<sup>307</sup>, Akt на Thr<sup>308</sup> и Ser<sup>473</sup> и ERK1/2 на Thr<sup>202</sup> и Tyr<sup>204</sup> у лимфоцитима испитаника. На крају су представљене статистичке методе коришћене за обраду добијених резултата (методе дескриптивне и аналитичке статистике применом статистичког пакета SPSS 18.0). Од метода дескриптивне статистике, коришћени су релативни бројеви, као и мере централне тенденције и варијабилитета, док су од метода аналитичке статистике коришћени параметарски и непараметарски тестови за процену значајности разлике и повезаности.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** (28 страна) подељено је у 12 целина и документовано је са девет табела и 21 сликом на којима је приказано 35 графикона као и девет слика које илуструју резултате western blot анализа. У првој и другој целини су описани и приказани демографски, антропометријски и клинички параметри испитаника, као и додатна терапија коју су испитаници користили поред инсулина. Добијени подаци су показали да је испитивану групу чинило 28 пацијената, у стању предгојазности, са васкуларним компликацијама старијих од 40 година код којих је постављена дијагноза ИДДМ са просечном дужином трајања обољења од 16 година. У трећој целини су представљени резултати хематолошких анализа, који су показали да су сви

хематолошки параметри били у границама референтних вредности у крви пацијената са ИДДМ. У четвртој целини су приказани резултати добијени мерењем параметара метаболизма глукозе након дванаесточасовног гладовања пацијената са ИДДМ. Добијени резултати мерења нивоа HbA1c у крви су указали на стање хипергликемије, које је у позитивној корелацији са дужином трајања ИДДМ. Такође, резултати су показали да је након десет третмана ХБК дошло до статистички значајног смањења како гликемије, тако и концентрације инсулина у крви пацијената са ИДДМ у односу на добијене вредности пре почетка терапије. У петој целини су описани и приказани резултати добијени мерењем концентрације параметара липидног профила: укупног холестерола, Tg, холестерола без HDL, HDL и LDL у плазми пацијената са ИДДМ. Добијени резултати су показали да је под утицајем терапије ХБК дошло до статистички значајног смањења концентрације свих испитиваних параметара липидног профила изузев концентрације HDL, за коју није забележена статистички значајна промена у односу на вредности добијене пре терапије. У шестој и седмој целини приказани су резултати добијени мерењем концентрације фосфолипида, укупних СМК, као и удела појединачних МК у односу на укупне МК плазме испитаника. Добијени и приказани резултати су показали да се концентрација фосфолипида није променила, али је дошло до статистички значајног смањења концентрације укупних СМК под утицајем терапије ХБК. Такође, резултати су показали да је под утицајем терапије дошло до смањења нивоа појединачних МК у плазми испитаника, као што су стеаринска киселина (18:0) - SFA,  $\alpha$ -линолеинска киселина (18:3) - n-3 PUFA и линолна киселина (18:2) - n-6 PUFA, као и повећања нивоа палмитинске киселине (16:0) - SFA, палмитолеинске киселине (16:1) - MUFA, докозапентаеноинске киселине (22:5) - n-3 PUFA и докозахексаеноинске киселине (22:6) - n-3 PUFA. У осмој целини су приказани резултати добијени мерењем концентрације маркера инфламације, као што су CRP, Hсу и NO у крви пацијената са ИДДМ, и добијени резултати су показали да је терапија ХБК утицала на статистички значајно смањење концентрације CRP и NO у серуму, док се концентрација Hсу у плазми није променила у односу на измерене вредности пре терапије. У деветој и десетој целини ове докторске дисертације су описани и представљени резултати мерења активности аргиназе у серуму и експресије и активности iNOS у лимфоцитима, ензима који су у конкуренцији за исти супстрат (L-аргинин). Добијени резултати су показали да је под утицајем терапије ХБК дошло до статистички значајног повећања активности аргиназе и смањења експресије и активности iNOS у лимфоцитима пацијената са ИДДМ. У једанаестој целини су приказани резултати мерења експресије сигналних молекула који регулишу експресију и активност iNOS у лимфоцитима испитаника. Добијени резултати су показали да је терапија ХБК довела до статистички значајног смањења експресије фосфорилисаног NF $\kappa$ B-p65 на Ser<sup>536</sup> и укупног NF $\kappa$ B-p65 у лимфоцитима, али и повећања фосфорилације NF $\kappa$ B-p65 на Ser<sup>536</sup>, добијене израчунавањем односа фосфорилисане и укупне форме. Терапија ХБК довела је и до статистички значајног смањења експресије фосфорилисаног IRS-1 на Ser<sup>307</sup> и укупног IRS-1, као и њиховог односа у поређењу са вредностима добијеним пре терапије. Такође је уочено да је након терапије ХБК дошло до статистички значајног пораста експресије како регулаторне субјединице p85 $\alpha$  тако и каталитичке субјединице p110 $\alpha$  PI3K у лимфоцитима испитаника. Даље добијени

резултати су показали да је дошло до статистички значајног смањења нивоа фосфорилисане Akt на Thr<sup>308</sup> и Ser<sup>473</sup>, укупног Akt и фосфорилације Akt на Ser<sup>473</sup>, док је фосфорилација Akt на Thr<sup>308</sup> била повећана у лизатима лимфоцита испитаника након терапије ХБК. Резултати даљих изучавања су показали да је експресија фосфорилисане ERK1/2 на Thr<sup>202</sup> и Tyr<sup>204</sup>, укупне ERK1/2, као и њене фосфорилације статистички значајно смањена у лимфоцитима пацијената са ИДДМ након терапије ХБК. У дванаестој целини приказани су резултати добијени мерењем експресије IGFBR-1 у серуму пацијената са ИДДМ, који су показали да је код пацијената који су били изложени ХБК дошло до статистички значајног повећања експресије IGFBR-1 у серуму.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** (17 страна) кандаткиња **Ивана Ресановић** је студиозно и критички разматрала добијене и приказане резултате. Узимајући у обзир резултате обухваћене овом докторском дисертацијом као и податке из литературе, кандаткиња је указала на утицај терапије ХБК на промену нивоа и састава МК у плазми, као и регулацију експресије и активности iNOS у лимфоцитима код пацијената са ИДДМ и васкуларним компликацијама. Поглавље **ДИСКУСИЈА** сачињено је од једне целине и поткрепљено је једним схематским приказом. Кандаткиња је дискусију резултата почела систематски, полазећи од резултата који приказују ефекте ХБК на параметре метаболизма глукозе у крви пацијената са ИДДМ и васкуларним компликацијама. Анализирани резултати су указали да терапија инсулином није адекватно контролисала гликемију испитаника ове студије, будући да су сви имали повишену концентрацију глукозе у крви, која је снижена након десет третмана терапије ХБК, као и концентрација инсулина у серуму пацијената. Кандаткиња је ове резултате објаснила чињеницом да је терапија ХБК смањујући хипоксију, за коју је познато да инхибира активност молекула сигналног пута инсулина, довела до активације сигналних молекула уључених у механизам деловања инсулина, што доприноси бољем преузимању глукозе од стране ћелија и смањењу гликемије. Томе у прилог иду и резултати клиничких истраживања који су показали да терапија ХБК често намеће потребу за смањењем дозе егзогеног инсулина код пацијената са ИДДМ. Даље су дискутовани и резултати утицаја терапије ХБК на липидни профил предгојазних пацијената са ИДДМ и васкуларним компликацијама. Добијени резултати су показали да је након десет третмана ХБК дошло до смањења концентрације свих липида, осим HDL у плазми испитаника у поређењу са почетним вредностима. Кандаткиња је добијене резултате смањења концентрације Tg довела у везу са претходно поменути резултатима смањења нивоа гликемије под утицајем терапије ХБК, с обзиром да је глукоза један од главних супстрата за синтезу Tg, те је смањење нивоа гликемије могло довести до смањења концентрације Tg у плазми. Потенцијални механизам могао би укључивати и омогућавање неометаног везивања липопротеина за њихове рецепторе на површини ћелијских мембрана, чиме се смањује концентрација липопротеина у крви пацијената са ИДДМ. У наставку дискусије, анализирани су и дискутовани резултати добијени мерењем концентрације фосфолипида, укупних СМК и нивоа појединачних МК у плазми пацијената са ИДДМ. Анализирани параметри су указали да код испитаника није дошло до промене у концентрацији фосфолипида под

утицајем ХБК, али је дошло до смањења концентрације СМК у плазми. Добијене резултате кандидаткиња је довела у везу са потенцијалном улогом ХБК у регулацији метаболизма масти код дијабетичара, узимајући у обзир да ХБК може утицати на повећање активности ензима укључених у  $\beta$ -оксидацију МК у митохондријама, као и на повећање експресије транскрипционих фактора укључених у метаболизам липида и липолизу, што доприноси смањењу концентрације СМК. Даље, добијени и анализирани резултати су показали да је терапија ХБК довела до смањења нивоа појединачних МК које имају инфламаторна својства као што су стеаринска- SFA и линолна киселине- n-6 PUFA, али и  $\alpha$ -линолеинске киселине- n-3 PUFA, као и повећања нивоа оних МК које остварују антиинфламаторна и антиатерогена својства, као што су палмитолеинска- MUFA, докозапентаеноинска и докозахексаеноинска киселина- n-3 PUFA, али и палмитинска киселина- SFA, која је позната по неповољним ефектима на организам. Добијени резултати су указали да терапија ХБК остварује антиинфламаторне и антиатерогене ефекте на пацијенте са ИДДМ смањујући ниво SFA и n-6 PUFA, и повећавајући ниво појединачних MUFA и n-3 PUFA које својим дејством могу редуковати неповољне ефекте које SFA и n-6 PUFA могу остварити на оболеле од ИДДМ. Такође, анализирани резултати као и резултати других аутора су указали да је једно од могућих објашњења раног утицаја терапије ХБК на промену нивоа и састава МК у плазми, то да ХБК може утицати на експресију и активност ензима укључених у елонгацију и десатурацију МК. Надаље су дискутовани резултати добијени мерењем параметара инфламације, који су показали да је под утицајем ХБК дошло до смањења концентрације CRP и NO у серуму пацијената, што је указало на антиинфламаторни ефекат ХБК код оболелих од ИДДМ. Кандидаткиња је добијене резултате довела у везу са смањењем концентрације глукозе и СМК у плазми, која даље утиче на смањење експресије инфламаторних цитокина, за које је показано да стимулишу синтезу CRP у јетри. Добијени резултати у сагласности су са резултатима других аутора, који су такође показали да терапија ХБК смањује концентрацију маркера инфламације и инфламаторних цитокина код пацијената са ДМ. Даље су анализирани резултати добијени мерењем активности аргиназе, који су показали да је терапија ХБК утицала на повећање активности аргиназе у серуму пацијената. Узимајући у обзир да ензим аргиназа и ензими iNOS користе исти супстрат (L-аргинин) и да су њихови нивои обрнуто пропорционални, кандидаткиња је добијене резултате објаснила тиме да се услед повећане активности аргиназе троши више супстрата, стога смањена доступност супстрата за iNOS може довести до смањене синтезе NO и ниже концентрације NO у серуму под утицајем ХБК, што је указало на смањену активност iNOS. У наставку дискусије, анализирани су и дискутовани резултати који се односе на регулацију експресије и активности iNOS у лимфоцитима пацијената са ИДДМ. Анализирани резултати су показали да је након десетог третмана ХБК дошло до смањења експресије iNOS у лимфоцитима, што указује на додатни антиинфламаторни ефекат терапије ХБК на пацијенте са ИДДМ. Кандидаткиња је добијене резултате довела у везу са значајно повећаним нивоом доказахексаеноинске киселине у плазми пацијената са ИДДМ узимајући у обзир литературне податке који су показали да ова МК инхибира експресију iNOS, тако што смањује релативну експресију инфламаторних цитокина, као и активност транскрипционог фактора укљученог у регулацију експресије iNOS.

Даље је мерењем нивоа NFκB-p65, који је укључен у регулацију експресије iNOS, показано да је под утицајем терапије ХБК дошло до смањења експресије NFκB-p65, као и повећања фосфорилације NFκB-p65 на Ser<sup>536</sup> у лимфоцитима пацијената са ИДДМ. Полазећи од литературних података који су недвосмислено показали да је активност NFκB-p65 регулисана на нивоу фосфорилације самог транскрипционог фактора и протеина који га инхибирају (IκB), и да фосфорилација NFκB-p65 на Ser<sup>536</sup> спречава транслокацију NFκB-p65 у једро, кандидаткиња је указала на смањену активацију NFκB-p65 под утицајем терапије ХБК. Такође, колегиница **Ресановић** је указала на то да је смањена експресија и активност NFκB-p65 у лимфоцитима пацијената под утицајем ХБК, довела до следственог смањења експресије iNOS у лимфоцитима ових пацијената. Даљи експерименти ове докторске дисертације су били усмерени на испитивање утицаја терапије ХБК на експресију и фосфорилацију IRS-1, PI3K, Akt и ERK1/2 у лимфоцитима испитаника. Анализирани и представљени резултати су показали да је терапија ХБК смањила експресију IRS-1, као и фосфорилацију IRS-1 на Ser<sup>307</sup>, и тиме индуковала фосфорилацију IRS-1 на специфичним Туг остацима тј. активацију IRS-1 у лимфоцитима пацијената са ИДДМ. Повећану активацију IRS-1 кандидаткиња је довела у везу са смањеном експресијом iNOS у лимфоцитима, узимајући у обзир податке из литературе који су показали да повећана експресија овог ензима доводи до протеолитичке деградације IRS-1. Активирани IRS-1 је неопходан за даљу активацију PI3K/Akt сигналног пута укљученог у регулацију експресије и активности iNOS. Резултати су показали да је терапија ХБК довела до повећања експресије регулаторне p85 и каталитичке субјединице p110 PI3K у лимфоцитима пацијената са ИДДМ, чиме је даље омогућена фосфорилација Akt на Thr остацима. Како је за потпуну активацију Akt потребно да се поред Thr остатака фосфорилишу и Ser остаци, кандидаткиња је даље дискутовала резултате добијене на основу мерења експресије и фосфорилације Akt на Thr<sup>308</sup> и Ser<sup>473</sup> у лимфоцитима испитаника. Анализирани резултати су показали да је терапија ХБК довела до смањења експресије укупног Akt и фосфорилације Akt на Ser<sup>473</sup>, и повећања фосфорилације Akt на Thr<sup>308</sup>, што је указивало на делимичну активацију Akt у лимфоцитима. Добијени резултати су у складу са резултатима других аутора који су показали да је ХБК инхибирала сигнални пут циљног молекула за рапамицин код сисара (mTOR), одговорног за фосфорилацију Akt на Ser остацима и на тај начин довела до смањене активности Akt. Узимајући у обзир да је потпуна активација Akt неопходна за активацију транскрипционог фактора NFκB-p65, кандидаткиња је указала да би непотпуна фосфорилација Akt у лимфоцитима испитаника могла да допринесе смањењу експресије и активности NFκB, као и последичном смањењу експресије iNOS под утицајем терапије ХБК. У регулацију експресије и активности iNOS, поред Akt укључена је и ERK1/2, стога је даље мерена експресија и фосфорилација ERK1/2 на Thr<sup>202</sup> и Туг<sup>204</sup> у лимфоцитима пацијената са ИДДМ. Добијени резултати су показали да је након терапије ХБК дошло до смањења експресије и фосфорилације ERK1/2 на Thr<sup>202</sup> и Туг<sup>204</sup> у лимфоцитима пацијената, што је указивало на смањену активацију ове киназе. Узимајући у обзир да активирани ERK1/2 омогућава фосфорилацију IκB, инхибиторног протеина NFκB, доводећи до ослобађања NFκB и његове активације, која резултира транскрипцијом гена укључених у процесе инфламације, кандидаткиња



је указала да је смањена активност ERK1/2 у лимфоцитима испитаника под утицајем ХБК спречила активацију NFκB-p65 и следствено смањила експресију iNOS. Даље, прегледом литературе није пронађен ни један рад који се односи на утицај ХБК на експресију IGFBP-1 у крви, стога је дискутован утицај терапије ХБК на експресију IGFBP-1 у серуму испитаника. Резултати добијени мерењем експресије IGFBP-1 у серуму су показали да је након десет третмана терапије ХБК дошло до повећања експресије протеина који везује IGF-1. Анализирани резултате кандидаткиња је довела у везу са смањеном концентрацијом инсулина под утицајем терапије ХБК с обзиром да је инсулин један од главних регулатора нивоа IGFBP-1 у крви. Узимајући у обзир све резултате добијене у оквиру ове докторске дисертације кандидат **Ивана Ресановић** је предложила механизам којим ХБК остварује антиинфламаторне и антиатерогене ефекте и потенцијално смањује васкуларне компликације код пацијената са ИДДМ, који је схематски приказала на слици 22).

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** (две стране), кандидаткиња је на јасан начин извела закључке који у потпуности произилазе из добијених резултата, а одговарају на постављене циљеве ове докторске дисертације. На основу добијених резултата који су приказани у овој докторској дисертацији, ауторка је закључила да је код пацијената са ИДДМ и развијеним васкуларним компликацијама након терапије ХБК дошло до смањења концентрације параметара метаболизма глукозе и масти, као и маркера инфламације у крви пацијената са ИДДМ. Такође, третман ХБК је допринео смањењу нивоа МК које имају инфламаторно дејство, док је повећао ниво МК које имају антиинфламаторно и антиатерогено деловање у крви пацијената са ИДДМ. Под утицајем терапије ХБК је дошло и до смањења експресије и активности iNOS у лимфоцитима пацијената са ИДДМ, и то највероватније механизмом који је укључивао делимичну активацију Akt, као и смањење активације ERK1/2, што је довело до смањене активације NFκB-p65 у лимфоцитима пацијената са ИДДМ. На основу резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације кандидаткиња је закључила да је третман ХБК имао значајно антиинфламаторно и антиатерогено деловање, и да би на тај начин могао посредно спречити развој васкуларних компликација код пацијената са ИДДМ. Приказани и дискутовани резултати у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан допринос разумевању молекулских механизма којима терапија ХБК утиче на промену нивоа и састава МК у плазми, и регулише експресију и активност iNOS у лимфоцитима пацијената са ИДДМ, што је од изузетне важности за развој ефикаснијих стратегија у лечењу васкуларних компликација код особа са ИДДМ.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** (51 страна) састоји се од 476 цитираних библиографских јединица. Обимно и адекватно коришћење литературних навода као и релевантност њиховог избора у потпуности је указало на проблематику ове дисертације као и студиозан приступ ауторке.

## Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

M22=5: Рад у истакнутом међународном часопису

1. **I. Resanovic**, Z. Gluvcic, B. Zaric, Sudar-Milovanovic E, Vucic V, Arsic A Nedic O, Sunderovic M, Gligorijevic N, Milacic D, Isenovic ER. **Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Fatty Acid Composition and Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1 in Adult Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Patients: A Pilot Study.** *Canadian Journal of Diabetes* (2019), doi: 10.1016/j.jcjd.2019.04.018.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1499267119300231>

M23=3: Рад у међународном часопису

1. **I. Resanovic**, Z. Gluvcic, B. Zaric, Sudar-Milovanovic E, Jovanovic A, Milacic D, Isakovic R, Isenovic E. R. **Early Effects of Hyperbaric Oxygen on Inducible Nitric Oxide Synthase Activity/Expression in Lymphocytes of Type 1 Diabetes Patients: A Prospective Pilot Study.** *International Journal of Endocrinology* (2019), doi: 10.1155/2019/2328505.

<http://downloads.hindawi.com/journals/ije/2019/2328505.pdf>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

34=0,5: Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. **Ivana Resanovic**, Zoran Gluvcic, Bozidarka Zaric, Milan Obradovic, Davorka Milacic, Olgica Nedic, Milos Sunderic, Nikola Gligorijevic, Esma R. Isenovic. **Effect of hyperbaric oxygen therapy on insulin signaling in type 1 diabetes mellitus patients.** 5<sup>th</sup> Annual International Conference on Nursing, 6-9 May 2019, Athens, Greece.

2. Arsic A, Vucic V, Petrovic S, **Resanovic I**, Gluvcic Z, Davorka Milacic and Isenovic R. E. **Hyperbaric oxygenation increase level of polyunsaturated fatty acids in plasma total lipids in diabetes patients.** Četvrti kongres fizioloških nauka Srbije sa međunarodnim učešćem, od 19.do 23. septembra, Niš, Zbornik radova i sažetak, 2018.

3. Vučić V, Paunović M, Arsić A, Gluvić Z, Petrović S, Ristić-Medić D, **Resanović I**, Zarić B, Isenović E. R. **Different alterations in plasma lipid fatty acid profiles in patients with diabetes mellitus type 1 versus type 2.** 6<sup>th</sup> Meeting of European Section and 7<sup>th</sup> Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS) (Vrnjačka Banja, Srbija, od 11. do 14. septembra 2019. godine)

## Провера оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом” ауторке **Иване Ресановић**, констатујем да утврђено подударање текста износи 19%. Овај степен подударности последица је преклапања са општим местима као што су скраћенице за типове дијабетеса, назива међународних организација, друштава и асоцијација које се баве истраживањем дијабетеса, назива студија, назива подналова у садржају других дисертација које су се бавиле сличним истраживањима, скраћенице назива коришћених хемикалија, назива аминокиселина, слободних радикала, сигналних молекула који су изучавани и њихових превода на српски језик и скраћенице, назива институција и департмана у којима је реализована докторска дисертација, објашњења начина спровођења експеримената и коришћења сличних израза код добро утврђених материјала и метода, димензија коришћене хроматографске колоне, састава пуфера, резултата из кандидатових објављених публикација, израза који се користе у легенди фигуре, референци које су цитиране у другим докторатима, што је у складу са чланом 9. Правилника. На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да је докторска дисертација **Иване М. Ресановић** написана у складу са образложењем наведеном у пријави теме и да садржи све неопходне елементе за овакву врсту рада. Резултати истраживања пружају јаснију слику о молекулским механизмима посредством којих ХБК утиче на промену нивоа и састава МК у плазми и регулацију експресије и активности iNOS у лимфоцитима предгојазних пацијената са ИДДМ и развијеним васкуларним компликацијама. Такође, представљени резултати указују да ХБК остварује антиатерогене и антиинфламаторне ефекте путем смањења гликемије, концентрације липида и СМК, маркера инфламације и експресије и активности iNOS у лимфоцита, као смањења нивоа појединачних МК које остварују инфламаторне ефекте и повећања нивоа оних МК које остварују повољне ефекте на пацијенте са ИДДМ.

Кандидаткиња је обрадила актуелну тему и добијени резултати представљају оригинални истраживачки допринос бољем разумевању молекулских механизма којима терапија ХБК остварује повољан ефекат на пацијенте са ИДДМ и васкуларним компликацијама. Имајући у виду све напред наведене чињенице, као и да је део поменутих истраживања инкорпориран у две публикације (M22 и M23) као и три саопштења са међународним учешћем (M34), од којих је једно усмена презентација, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да прихвати овај извештај и одобри **Ивани М. Ресановић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом: „Утицај терапије кисеоником под хипербаричним условима на ниво и састав масних киселина у плазми, и регулацију експресије и активности индуцибилне азот-моноксид-синтазе у лимфоцитима пацијената са инсулин-зависним дијабетесом”.

КОМИСИЈА:

У Београду, 15.11.2019. године

---

др Јелена Ђорђевић, редовни професор,  
Универзитет у Београду- Биолошки факултет

---

др Божидарка Ј. Зарић, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду-Институт за нуклеарне науке "Винча"

---

др Зоран Глувић, доцент,  
Универзитет у Београду-Медицински факултет